

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto

Elintarvikehygienian oppiaine

Ruokakäyttöön kasvatettavien sirkkojen mikrobiyhteisöt ja mikrobiologiset riskit

Matias Leminen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma 2017



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osasto	
Tekijä - Författare – Author Matias Leminen			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Ruokakäyttöön kasvatettavien sirkkojen mikrobiyhteisöt ja mikrobiologiset riskit			
Oppiaine - Läroämne – Subject Elintarvikehygienia			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year 10/2017	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 37	
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Hyönteisten myyminen ja tarjoaminen ihmisravinnoksi ei ole tutkielman kirjoittamishetkellä sallittua Suomessa. Hyönteisten ruokakäyttöä kohtaan kohdistuu kuitenkin suuria odotuksia, sillä hyönteisten kasvatuksesta toivotaan ympäristöystävällisempää ja tehokkaampaa vaihtoehtoa perinteiselle eläinperäisen proteiinin tuotannolle. Elintarvikeeturvallisuuden varmistamisen kannalta on tärkeää selvittää millaisia bakteereja elintarvikkeeksi kasvatetut sirkat kantavat, jotta mikrobiologisia riskejä voidaan ennaltaehkäistä. Elintarvikkeeksi kasvatettujen sirkkojen mikrobiyhteisöistä on kuitenkin tutkittu hyvin niukasti. Tämän tutkimuksen tavoitteena olikin selvittää elintarvikkeeksi kasvatettujen kotisirkkojen tyypillisen mikrobiyhteisön rakenne ja tunnistaa sirkoissa esiintyvien maitohappobakteerien valtalajeja.</p> <p>Mikrobiyhteisön rakenne selvitettiin seitsemästätoista sirkkanäytteestä käyttäen 16S rRNA-geenin amplikonisekvenssianalyysiä. Sirkkanäytteissä mikrobiyhteisön valtalajeista keskimäärin 15% oli <i>Enterococcus</i> -sukua, 12% <i>Porphyromonadaceae</i> -heimoa, 12% <i>Enterobacteriaceae</i> -heimoa, 10% <i>Lachnospiraceae</i> -sukua, 7% <i>Lactococcus</i> -sukua, 6% <i>Staphylococcus</i> -sukua, 6% <i>Bacteroides</i> -sukua ja 5% <i>Ruminococcaceae</i> -heimoa. Yhteensä 24% bakteereista oli näytteissä harvinaisia, eli niitä oli kaikissa näytteissä alle 1%.</p> <p>Viidestätoista eri sirkkanäytteestä määritettiin aerobisten mikro-organismien, enterobakteerien, lämpökestoisten koliformisten bakteerien, maitohappobakteerien ja homeiden ja hiivojen pesäkelukumäärät. Näytteistä 5 kpl oli 24h paastonneista sirkoista ja 10 kpl paastoamattomista sirkoista. Aerobisten mikro-organismien pesäkelukumäärä oli paastonneissa sirkoissa keskimäärin 8,90 log pmy/g ja paastoamattomissa sirkoissa 8,17 log pmy/g, enterobakteerien määrä vastaavasti 6,52 log pmy/g ja 5,58 log pmy/g, koliformisten bakteerien 7,71 log pmy/g ja 4,24 pmy/g, maitohappobakteerien 7,89 pmy/g ja 7,72 pmy/g ja homeiden ja hiivojen 5,35 pmy/g ja 4,48 pmy/g.</p> <p>Maitohappobakteerien valtalajeja tunnistettiin ribotyypittämällä MRS-maljoilta valittuja bakteeri-isolaatteja. Näytteistä eristettiin yhteensä 72 maitohappobakteeri-isolaattia, joista 33 kpl oli paastonneista sirkoista ja 39 kpl paastoamattomista sirkoista. Isolaateista 13 kpl oli <i>Enterococcus raffinosus</i>, 2 kpl <i>Enterococcus faecalis</i> ja 9 kpl <i>Lactococcus garviaeta</i>. Isolaateista 19 kappaletta ryvästyivät enterokokkityypikantojen rinnalle ja 4 kpl laktokokkityypikantojen rinnalle. 25 isolaattia jäi kokonaan tunnistamatta.</p> <p>Tulosten perusteella ruokakäyttöön kasvatettujen sirkkojen mikrobiyhteisö koostuu laajasti eri bakteerilajeista. Suuri osa mikrobeista on todennäköisesti sirkkojen suoliston bakteereja, sillä monet lajit ovat varsinkin nisäkkäillä osa suoliston mikrobiomia. Sirkoissa on paljon elinkelpoisia bakteereja, ja maitohappobakteerit ovat niiden valtalajeja. Suuren mikrobimäärän takia sirkat voivat tarvita prosessointia, joka vähentää bakteerimäärää, jotta niiden säilyvyys voidaan taata. Mikrobimäärän vuoksi myöskään mikrobiologisten ohjausarvojen asettaminen käsittelemättömille sirkoille voi olla hankalaa, ja tulevaisuudessa ne kannattaakin määrittää ennemminkin prosessoiduille sirkoille. Raaoilta sirkoilta voidaan kuitenkin vaatia esimerkiksi salmonellavapautta, jota vaaditaan myös kaikilta lihatuotteilta.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Achaete domesticus, Kotisirkka, hyönteisruoka, hyönteisravinto			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s) Työn johtaja Johanna Björkroth Työn ohjaaja Elina Säde			

Sisällys

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	2
2.1 Hyönteisiä odotetaan ruokaketjuun	2
2.2 Kotisirkat tuotantoeläiminä	4
2.3 Sirkasta ruuaksi tai rehuksi	5
2.4 Ruokahyönteisten turvallisuuden arvioiminen.....	7
2.5 Kotisirkkojen mikrobiologia ruokaketjun näkökulmasta	8
2.5.1 Terveydelle haitalliset mikrobit	9
2.5.2. Yleisen hygieenisen laadun ja säilyvyyden indikaattorimikrobit	10
2.6 Sirkkojen mikrobiyhteisöjen tutkimus	12
3 TUTKIMUKSEN TAVOITE.....	15
4 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	16
4.1 Kotisirkat, näytteenotto ja homogenisointi.....	16
4.2 Bakteeriyhteisön rakenteen selvittäminen 16S rRNA-geenin amplikonisekvenssianalyysiin perustuen.....	16
4.2.1 DNA:n eristys	16
4.2.2 16S rRNA-amplikonisekvenssianalyysi.....	17
4.3 Bakteeritasojen määrittäminen mikrobiologisista menetelmin	18
4.4 Maitohappobakteerien tunnistaminen HindIII-ribotyypin perustuen	18
5 TULOKSET	21
5.1 16S rRNA-amplikonien sekvenssianalyysi.....	21
5.2 Mikrobiologiset määritykset	22
5.3 Maitohappobakteerien ribotyypitys.....	23
6 POHDINTA	24
6.1 Sirkkojen mikrobiyhteisöt	24
6.2 Mikrobin pesäkelukumäärät.....	25
6.3 Maitohappobakteerien valtalajit	27
6.4 Johtopäätökset	29
KIITOKSET	30
LÄHDEKIRJALLISUUS.....	31
LIITTEET	37

1 JOHDANTO

Sirkkojen ja niistä saatavien tuotteiden myyminen ja tarjoaminen ihmisravinnoksi ei ole tutkielman kirjoittamishetkellä sallittua Suomessa. Sirkkojen ja muiden hyönteisten elintarvikkeeksi kasvattamista kohtaan kohdistuu kuitenkin suuria odotuksia, sillä niistä odotetaan uutta vaihtoehtoa perinteisille eläinperäisen proteiinin tuottamistavoille. Hyönteisten kasvattamisen toivotaan tuottavan vähemmän kasvihuonekaasuja ja pystyvän tuottamaan korkealaatuista proteiinia käyttäen vähemmän ja heikkolaatuisempaa ravintoa verrattuna esimerkiksi naudan- tai sianlihantuotantoon (EFSA Scientific Committee 2015). Evira valmisteleeikin tutkielman kirjoittamishetkellä elintarvikealalle hyönteistuotantoon ja myyntiin liittyvää ohjeistusta, jonka valmistumisen jälkeen hyönteistuottajat voivat rekisteröityä elintarvikealan toimijoiksi ja hyönteisruuan myyminen muuttuu sallituksi (Evira 2017b)

Elintarvikkeeksi kasvatettujen sirkkojen mikrobiyhteisöistä ja yhteisöjen sisältämistä ihmisille patogeenisistä tai muutoin haitallisista bakteereista on vain vähän tutkittua tietoa. Elintarvikeeturvallisuuden varmistamisen kannalta on tärkeää selvittää millaisia bakteereja ravinnoksi tarkoitetut sirkat kantavat, jotta ruokaketjun mikrobiologisia riskejä voidaan ennaltaehkäistä ja torjua elintarvikeketjun eri vaiheissa. Sirkoille ominaisten mikrobiomien tunteminen auttaa myös kehittyvää sirkkataloutta tunnistamaan sirkoille hyödyllisiä tai tuotannon kannalta haitallisia mikrobeja ja mikrobiyhteisöjä.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kartoittaa elintarvikekelpoisiksi tarkoitettujen kotisirkkojen mikrobiyhteisöjä. Oletuksena oli, että mikrobiyhteisö tulee koostumaan laajasti eri sukujen bakteereista ja maitohappobakteerit tulevat olemaan näytteiden valtalajeja. Mikrobiyhteisön maitohappobakteerien valtalajeja myös tunnistettiin lajitasolle asti.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Hyönteisiä odotetaan ruokaketjuun

Ihmiset ovat syöneet hyönteisiä jo tuhansien vuosien ajan, ja esimerkiksi monissa Kaakkois-Aasian, Afrikan ja Etelä-Amerikan maissa hyönteiset ovat osa ihmisten ruokavaliota. Länsimaissa kulttuureissa hyönteisten syöminen on kuitenkin harvinaista ja paikoitellen sitä on pidetty jopa tabuna. Maailmassa on kuitenkin arvioitu olevan jopa kaksi tuhatta hyönteislajia, joita ihmiset käyttävät ravinnokseen (Van Huis ym. 2013, EFSA Scientific Committee 2015). Nykykäsityksen mukaan ihmiset myös kasvattavat ainakin kahtakymmentä eri hyönteislajia joko ravinnokseen tai eläinten rehuksi (EFSA Scientific Committee 2015).

Koska hyönteisiä syödään länsimaissa hyvin vähän, ei niitä ole myöskään kasvatettu ravinnoksi. Esimerkiksi Euroopassa onkin lähinnä tarhattu mehiläisiä niiden tuottaman hunajan takia. Lisäksi tiettyjä kirvoja kasvatetaan niiden kuoresta saatavan punaisen elintarvikevärin (E 120) tuottamiseksi ja joitain hyönteisiä hyötykasvien tuholaisyönteisten biologista torjuntaa varten (Van Huis ym. 2013). Täten hyönteisten käyttämistä elintarvikkeena ja niiden kasvattamista on tutkittu hyvin vähän. Hyönteisten elintarvikekäyttö esimerkiksi Euroopassa rajoittuu myös siihen, että Euroopan unionin lainsäädäntö ei salli hyönteisten myyntiä elintarvikkeena (EFSA Scientific Committee 2015).

Hyönteisten elintarvikkeena ja tuotantoeläinten rehuna käyttämistä kohtaan on kuitenkin viime vuosina herännyt suuria odotuksia. Raportissaan Van Huis ym. (2013) toteavatkin, että hyönteisten kasvatuksen toivotaan tarjoavan ympäristöystävällisemmän tavan tuottaa proteiinia kuin perinteisen eläintuotannon. Hyönteistuotannon toivotaankin myös hyödyntävän elintarvikeketjun sivuvirtoja ja ylijäämiä, sillä hyönteisten pystyisivät hyödyntämään ravintonaan myös esimerkiksi biojätteitä. Hyönteisten kasvatuksen uskotaan tuottavan vähemmän kasvihuonekaasuja ja tarjoavan paremman rehunhyötysuhteen verrattuna esimerkiksi sian- tai naudanlihan tuotantoon. Hyönteisten kasvattaminen voisi olla myös aloituskustannuksiltaan edullisempaa kuin merkittävän mittaluokan lihantuotanto ja

siihen tarvitaan huomattavasti vähemmän maapinta-alaa. Hyönteistuotannossa pystyttäisiin hyödyntämään myös jo pois käytöstä jääneitä rakennuksia, kuten tehdashalleja tai navetoita, ja Suomessakin tuotanto voi olla ilmasto-oloista huolimatta läpivuotista. Hyönteistuotanto voisi myös tarjota kehittyville maille mahdollisuuden omavaraisempaan proteiinintuotantoon, mikä vähentäisi maiden riippuvuutta tuontisoijasta (Van Huis ym. 2013).

Asiantuntijoiden lisäksi myös kuluttajat ovat kiinnostuneita hyönteisten ruokakäytöstä. Vaikka lihan ja varsinkin broilerin kulutus on edelleen kasvussa Suomessakin, on lihan syömisen vähentäminen ja kokonaan kasvisruokavalioon siirtyminen saanut suurta huomiota mediassa ja kasvisruokavalio kiinnostaa ihmisiä. Belgialaisessa tutkimuksessa todettiin, että kuluttajat, jotka aikovat vähentää lihan syömistä olisivat jopa 4,5 kertaa todennäköisempiä hyväksymään hyönteiset ruokavalioonsa (Verbeke 2015). Lisäksi ravinnon ympäristövaikutuksista kiinnostuneet ovat valmiimpia syömään hyönteisiä (Verbeke 2015). Toisessa belgialaisessa tutkimuksessa todettiin, että haastatelluista melkein puolella oli kielteinen ennakoasenne hyönteisravintoa kohtaan, mutta tarjottuja hyönteisiä syötyään kuitenkin jopa 70 % haastatelluista oli valmiita syömään hyönteisiä uudelleen (Caparros Megido ym. 2014). Turun yliopiston tiedotteessa (2016) kuitenkin todetaan, että suomalaisista jopa 70 % on kiinnostunut hyönteisruoasta. Suomalaiset kokevat hyönteisruoan esteeksi useimmiten epätietoisuuden hyönteisten aistittavasta laadusta ja niiden turvallisuudesta (Turun yliopisto 2016). Uusien asioiden pelon onkin todettu olevan suuri tekijä uusien elintarvikkeiden, kuten hyönteisten, hyväksynnässä (Caparros Megido ym. 2014, Verbeke 2015).

Voidaankin ajatella, että jos trendi lihansyönnin ympäristövaikutusten tiedostamisesta jatkuu, tulee hyönteisten syömisestä länsimaissakin entistä hyväksytympää. Ennen kuin hyönteisiä saadaan koko Euroopan Unionissa ruokaketjuun, tarvitaan myös lainsäädännön muutos, joka sallii hyönteisten myymisen elintarvikkeena. Jos jokin EU:n jäsenvaltio voi osoittaa hyönteisten käyttöhistorian elintarvikkeena EU:n alueella ennen vuotta 1997, voidaan hyönteiset hyväksyä elintarvikkeiksi nopeastikin, sillä niitä ei siten pidettäisi uuselintarvikkeina (Evira 2016). Suomi on vuoden 2017 aikana kuitenkin päättänyt muuttaa tulkintaansa Euroopan

unionin uuselitarvikelaista kokonaisten hyönteisten kohdalla ja Evira valmistelee alaa koskevaa ohjeistusta, jolla varmistetaan tuotteiden turvallisuus kuluttajille (Evira 2017b). Ohjeistuksen on tarkoitus valmistua jo marraskuussa 2017, jonka jälkeen hyönteistuottajat voivat rekisteröityä elintarvikealan toimijoiksi ja kasvatettujen kokonaisten hyönteisten myyminen elintarvikkeeksi mahdollistuu (Evira 2017b).

2.2 Kotisirkat tuotantoeläiminä

Kotisirkka (*Acheta domesticus*) on suorasiipisten (*Orthoptera*) lahkoon kuuluva hyönteislaji. Samaan lahkoon kuuluvat sirkat, heinäsiirakat ja hepokatit. Kotisirkka on levinnyt myös Suomeen vieraslajina ja sitä tavataan esimerkiksi kaatopaikoilla ja kasvihuoneissa (Suomen Lajitietokeskus). Kotisirkkaa kasvatetaan monissa länsimaissa esimerkiksi lemmikkien ruoaksi ja esimerkiksi Hollannissa myös ihmisten ravinnoksi (EFSA Scientific Committee 2015). Kotisirkkojen kasvattaminen myös tuotantoeläinten rehuksi on sallittua EU:n alueella (Evira 2017a).

Kotisirkkojen tuotanto on jaettavissa kahteen vaiheeseen, munintaan ja kasvatusvaiheeseen, mikä on verrattavissa esimerkiksi broilerintuotantoon. Munintavaiheessa aikuiset sirkat munivat erilliseen alustaan, jossa nymfit kuoriutuvat (EFSA Scientific Committee 2015). Suomessa muninta-alustana on käytetty esimerkiksi kookoskuitua. Kuoriutumisen jälkeen nymfit siirretään omiin kasvatuslaatikkoihinsa, joissa nymfit luovat nahkansa useita kertoja viimeiseen nymfivaiheeseen asti ja kasvavat riittävän kokoisiksi kerättäviksi (Clifford & Woodring 1990).

Kotisirkkoja pystytään kasvattamaan perinteiseen eläintenpitoon ja lihantuotantoon verrattuna pienissä tiloissa. Sirkkoja voidaan kasvattaa muovilaatikoissa tai terraarioissa, joissa niille tarjotaan ravinnoksi esimerkiksi kananrehua tai kasviksia (EFSA Scientific Committee 2015). Nykyisen EU:n lainsäädännön mukaan hyönteisiä pidetään tuotantoeläiminä kuten nautoja ja broilereitakin, eikä niiden ravintona saa siksi käyttää esimerkiksi kalaa tai lihaa sisältäviä ruokajätteitä tai lantaa (EFSA Scientific Committee 2015). Vettä voidaan tarjoilla sepelin tai hiekan seasta tai sieniin tai rätteihin imeytettynä. Laatikkoon

voidaan laittaa esimerkiksi munakennoja, jotta sirkoille on piiloutumispaikkoja ja enemmän sirkkoja voidaan kasvattaa samassa laatikossa.

Sirkat kuoriutuvat muninnan jälkeen noin 13 vuorokaudessa, jonka jälkeen kasvuvaihe viimeiseen nymfimuotoon kestää 6 - 7 viikkoa (Clifford & Woodring 1990). Sirkoista saadaan siis lihaan verrattuna proteiinia nopeammin kuin naudasta, siasta tai broilerista. Sirkkojen rehuhyötysuhteen on joissain tutkimuksissa kuvattu olevan jopa parempi kuin broilereilla (Nakagaki & Defoliart 1991), mutta suuremmassa mittakaavassa kasvatettujen sirkkojen rehuhyötysuhde oli broilerinrehulla lähes sama, kuin broilerinkin (Lundy & Parrella 2015). Molemmissa tutkimuksissa sirkkojen rehuhyötysuhde oli kuitenkin huomattavasti parempi kuin sikojen tai märehitijöiden. Sirkkojen rehuna voidaan käyttää myös biojätteestä tuotettavan lannoitteen sivutuotteena syntyvää kiinteää jätettä. Tällä jätteellä sirkat saatiin kasvatettua viimeiseen nymfimuotoon ja kerättävän kokoisiksi, rehuhyötysuhteen ollessa kuitenkin heikompi kuin broilerinrehulla (Lundy & Parrella 2015). Lundyn ja Parellan (2015) tutkimuksessa käsittelemättömällä biojätteellä, kuten ruoantähteillä sirkkojen kasvu oli kuitenkin liian hidasta ja kuolleisuus nousi huomattavasti ennen keräämiseen riittävää ikää ja kokoa.

Monissa sirkkakasvattamoissa sirkkoja paastotetaan ennen keräämistä, jotta niiden suolisto tyhjenee ja lopulliseen tuotteeseen päätty mahdollisimman vähän suolen sisältöä ja täten suolistoperäisiä mikrobeja (EFSA Scientific Committee 2015). Keräämisen jälkeen sirkat lopetetaan yleisesti pakastamalla (EFSA Scientific Committee 2015).

2.3 Sirkasta ruuaksi tai rehuksi

Lopettamisen jälkeen sirkoista voidaan prosessoida esimerkiksi jauhetta, tahnaa, eri osat erottamalla esimerkiksi öljyä ja kitiiniä tai sirkat voidaan myydä kokonaisina (EFSA Scientific Committee 2015). Kokonaisia sirkkoja yleensä käsitellään ennen markkinointia esimerkiksi keittämällä, kuivaamalla ja pakastamalla tai niitä voidaan myydä esimerkiksi friteerattuina ja maustettuina pikkupurtavana. Jos sirkat myydään

kokonaisina, suositellaan ruokailukokemuksen parantamiseksi aikuisten sirkkojen siipien ja jalkojen poistamista (EFSA Scientific Committee 2015).

Jauhettuja, tahnaksi käsiteltyjä tai eri komponentteihin jaoteltuja sirkkoja voidaan käyttää elintarviketeollisuuden raaka-aineina tai rehuna tuotantoeläimille, eikä niitä yleensä markkinoida suoraan kuluttajille (EFSA Scientific Committee 2015). Sirkkojen tarkat käsittelytavat ja esimerkiksi eri komponentteihin jakaminen ovat usein yritysten liikesalaisuuksia, eikä niistä ole tarkkaa tietoa. Teollisilla toimijoilla on yleensä kuitenkin tavoitteena saada eroteltua proteiinit, rasvat ja kitiini toisistaan ilman liuottimien käyttöä. (EFSA Scientific Committee 2015).

Jo nyt hyönteisiä tai hyönteisperäistä rehua saa käyttää rehuna lemmikeille ja turkiseläimille, jopa elävinä, kunhan hyönteiset eivät ole uhanalaisia, tautia aiheuttavia tai haitallisia vieraslajeja (Evira 2017a). Tuotantoeläinten rehuksi saa tällä hetkellä Suomessa kasvattaa seitsemää eri hyönteislajia (taulukko 1). Eläviä tai kuolleita hyönteisiä saa käyttää rehuna kaikille tuotantoeläimille paitsi märehijöille ja hyönteisistä saatua rasvaa saa käyttää kaikkien eläinlajien rehussa, mutta hyönteisperäistä käsiteltyä proteiinia vain lemmikeille, turkiseläimille ja vesiviljelyeläimille (Evira 2017a). Hyönteisten kasvatusta ja niistä rehun valmistamista pidetään rehualan toimintana, joten toimijan on myös rekisteröidyttävä rehualan toimijaksi (Evira 2017a).

Hyönteiset ovat luonnossakin osa kanojen, kalojen ja sikojen ravintoa, joten ne sopivat hyvin osaksi rehua. Hyönteisiä onkin käytetty esimerkiksi kalojen ja kanojen ravintona esimerkiksi Kiinassa ja osissa Afrikkaa (EFSA Scientific Committee 2015). Useissa tutkimuksissa onkin todettu, että kalajauho tai soijaproteiini voidaan sikojen ja broilereiden rehussa korvata jopa kokonaan hyönteisperäisellä proteiinilla, kun taas kalojen rehussa vain osa proteiineista voi olla hyönteisperäistä tai kasvu hidastuu (EFSA Scientific Committee 2015).

Taulukko 1 EU:ssa tuotantoeläinten rehuksi sallitut hyönteiset

Hyönteisen suomenkielinen nimi	Latinankielinen nimi
Huonekärpänen	<i>Musca domestica</i>
Jauhopukki	<i>Tenebrio molitor</i>
Kanatunkkari	<i>Alphitobius diaperinus</i>
Kenttäsirkka	<i>Gryllus assimilis</i>
Kotisirkka	<i>Acheta domesticus</i>
Sotilaskärpänen	<i>Hermetia illucens</i>
Trooppinen kotisirkka	<i>Gryllodes sigillatus</i>

Lähde: (Evira 2017a)

2.4 Ruokahyönteisten turvallisuuden arvioiminen

Hyönteisten elintarvikekäyttöön liittyvät riskit täytyy tuntea ennen kuin hyönteisiä voidaan lainsäädännöllisesti hyväksyä elintarvikkeiksi. Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisten tiedekomitean raportissa (2015) todetaankin, että hyönteisravinnon turvallisuutta arvioidessa on otettava huomioon niin biologiset, kemialliset kuin esimerkiksi allergeenisuuteenkin liittyvät riskit. Biologisen riskin voivat muodostaa esimerkiksi bakteerit, virukset, parasiitit tai tietyissä tapauksissa jopa prionit. Kemiallisia riskejä ovat esimerkiksi raskasmetallijäämät ja hyönteisiin kertyvät tai niiden itse tuottamat myrkyt. Jos hyönteistuotannossa käytetään hormoneja tai lääkeaineita, on myös arvioitava riski niiden päätyemisestä ruokaketjuun (EFSA Scientific Committee 2015).

On myös otettava huomioon, että myös kuluttajia arveluttaa hyönteisravinnon turvallisuus, ja moni kuluttaja jopa kokee sen esteeksi hyönteisten syömiselle (Turun yliopisto 2016). Myös elintarvikealan toimijat haluavat varmistaa valmistamiensa elintarvikkeiden turvallisuuden, joten ne eivät halua käyttää raaka-aineita, joiden riskejä ei tunneta eikä tuotteiden turvallisuudesta tai tasalaatuisuudesta ole takeita. Tutkimusten avulla onkin pystyttävä selvittämään hyönteisravinnon riskit ja kehittämään käytänteet, joilla riskejä voidaan hallita ja tuotteiden turvallisuus varmistaa.

2.5 Kotisirkkojen mikrobiologia ruokaketjun näkökulmasta

Euroopan yhteisön Komission asetuksessa (EY) N:o 2073/2005 määritellään elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, joiden tavoitteena on varmistaa elintarvikkeiden turvallisuus. Mikrobiologiset vaatimukset määrittelevät esimerkiksi sen, saako jotain mikro-organismeja esiintyä ollenkaan tai kuinka paljon tietyssä määrässä tutkittua elintarviketta. Mikrobimäärien rajat määritellään usein kahdella raja-arvolla *m* ja *M*. Tulokset ovat hyväksyttäviä, jos kaikkien näytteiden mikrobimäärät ovat alle arvon *m*, varauksin hyväksyttäviä, jos sallittu määrä näytteistä on välillä *m* ja *M* ja ei hyväksyttäviä, jos osa näytteistä antaa arvon joka on yli *M*:n tai liian moni näytteistä on välillä *m* ja *M*. Näillä vaatimuksilla määritellään tietyn tuotteen, elintarvike-erän tai prosessin hyväksyttävyys elintarvikeketjuun (Evira 2009).

Euroopan yhteisön Komission asetuksessa (EY) N:o 2073/2005 mikrobiologiset vaatimukset on jaettu kahteen osaan. Elintarvikkeiden turvallisuutta koskevat vaatimukset pyrkivät varmistamaan, ettei elintarvikkeen mukana leviä ihmisille patogeenisiä bakteereja. Tuotteen on oltava turvallinen myyntiajan loppuun asti. Ainoan poikkeuksen muodostaa *Listeria monocytogenes*, josta vaatimuksena on, että sitä ei todeta 25 grammassa tuotetta, jos toimija ei voi osoittaa, ettei tuotteessa ylity 100 pmy/g tuotteen myyntiajan lopussa. Prosessin hygieniää koskevilla vaatimuksilla taas pyritään varmistamaan tuotantoprosessin hygieenisuus ja kelpaavuus elintarvikeketjuun (Komission asetus (EY) N:o 2073/2005, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista).

Mikrobikriteerien toteutumisen valvominen ja täten tutkimusten teettäminen kuuluu elintarvikealan toimijalle (Evira 2009). Toimijan on myös määriteltävä tuotteiden säilyvyys- ja myyntiaika. Tarvittaessa säilyvyyden määrittämiseksi on tehtävä mikrobiologisia tutkimuksia, ja varsinkin *Listeria monocytogenes* -bakteerin löytymistä tuotteesta on tutkittava, jos se voi kasvaa tuotteessa myyntiaikana (Evira 2009). Säilyvyysajan määrittelemisen avuksi Elintarviketeollisuusliitto (ETL) on muodostanut mikrobiologisia ohjausarvoja eri elintarvikkeiden viimeisille käyttöpäiville (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Nämä ohjausarvot eivät ole lainvoimaisia, ja ne on tarkoitettu toimijoiden avuksi, sillä Eviran

ohjeen ja komission asetuksen ulkopuolelle jää paljon elintarvikkeita (Elintarviketeollisuusliitto 2017).

Koska hyönteiset eivät ole tutkielman kirjoitushetkellä sallittuja elintarvikkeita, ei niiden elintarviketurvallisuudelle ole myöskään asetettu mikrobiologisia vaatimuksia tai ohjausarvoja. Oletettavaa kuitenkin on, että elintarvikkeina hyönteisten on täytettävä hyvin samanlaiset mikrobiologiset vaatimukset, kuin muidenkin jo nyt sallittujen elintarvikkeiden. Koska sirkat ovat aktiivisen veden ja kosteussisältönsä suhteen melko lähellä lihaa (Vandeweyer ym. 2016), ovat ne lihan tapaan helposti pilaantuvia ja niiden säilyvyys edellyttää kylmäketjua.

2.5.1 Terveydelle haitalliset mikrobit

Siinä missä perinteisessä eläintuotannossa eläimet voivat kantaa ihmisille patogeenisia mikrobeja ja osa eläinten taudinaiheuttajista on myös zoonoottisia, pidetään hyönteisten patogeeneja ihmisille turvallisina (Van Huis ym. 2013). Syy tähän on se, että hyönteiset ja ihmiset poikkeavat fysiologisesti ja aineenvaihdunnaltaan niin paljon toisistaan (Van Huis ym. 2013). Hyönteisten mikrobiomeihin voi kuitenkin kuulua myös ihmiselle patogeenisia mikrobeja joko luontaisesti tai kontaminaation kautta (ANSES 2014). Siksi onkin tärkeää, että hyönteiskasvattamoiden bioturvallisuuteen kiinnitetään huomiota ja valmistettavia tuotteita käsitellään samoja hygieniastandardeja noudattaen, kuten muitakin elintarvikkeita.

Monista muista tuotantoeläimistä poiketen, hyönteisissä ei ole pystytty todistamaan esimerkiksi *Salmonella*-bakteerin lisääntymistä, vaikka hyönteiset olisivat olleet kontaktissa esimerkiksi salmonellan saastuttamaan rehuun (EFSA Scientific Committee 2015). Monissa tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että hyönteiset voivat levittää patogeenisia bakteereja, kuten Salmonellaa, pinnallaan ja suolistossaan (Holt ym. 2007, Roche ym. 2009, Leffer ym. 2010). On myös todettu, että kontaminoituneiden hyönteisten syöttäminen kanoille voi saada aikaan Salmonellan kolonisoitumisen lintujen suolistoon (Holt ym. 2007). Lieneekin siis mahdollista, että myös ihmiset voivat saada tartunnan hyönteisistä, joissa on esimerkiksi Salmonella-

bakteereja. On kuitenkin huomionarvoista, että tutkimuksissa bakteereita pystyttiin eristämään hyönteisistä vain muutaman päivän ajan (Shane ym. 1985). Tutkimukset salmonellan leviämisestä hyönteisten välityksellä on useimmiten kuitenkin tehty karpäsillä, sillä ne ovat yleisiä perinteisen eläintuotannon tiloilla. Tulokset eivät tämän takia välttämättä vastaa esimerkiksi salmonellan lisääntymistä tai säilymistä sirkkatuotannossa.

Suomessa kansallinen salmonellavastustusohjelma korvaa suurelta osin mikrobiologisten vaatimusten mukaisen salmonellavalvonnan teurastamoissa, sillä salmonellaa esiintyy suomalaisissa tuotantoeläimissä niin vähän (Evira 2009). Käytännössä mikrobiologisten vaatimusten ja kansallisen vastustusohjelman mukaan Salmonellaa ei saa esiintyä ollenkaan missään elintarvikkeeksi päätyvästä tuotteesta (Evira 2009). Kun elintarvikkeeksi kasvatettuja sirkoja on seulottu esimerkiksi *Salmonella*-, *L. monocytogenes*- tai *Clostridium perfringens* -bakteerien varalta, ei kyseisiä taudinaiheuttajia ole sirkoista löytynyt (Giaccone 2005, NVWA 2014, Vandeweyer ym. 2016). Voidaan siis ajatella, että hyönteiset täyttävät mikrobivaatimukset patogeeneiden osalta, kunhan kasvatusprosessin hygieniä ja bioturvallisuus ovat kunnossa. Giaccone (2005) kuitenkin toteaa, että sirkojen käsitteleminen esimerkiksi keittämällä on elinkelpoisten bakteerien vähentämiseksi kannattavaa, sillä on mahdollista, että sirkkoihin on päätynyt ihmisten patogeeneja kontaminaation kautta.

2.5.2. Yleisen hygieenisen laadun ja säilyvyyden indikaattorimikrobit

Elintarvikeprosessien ja tuotteiden hygieniää valvotaan yleisten hygieenisen laadun indikaattorimikrobien määrityksillä. Näitä määrityksiä ovat esimerkiksi enterobakteerien, *Escherichia coli*:n ja aerobisten mikro-organismien pesäkelukumäärät. Enterobakteerien ja aerobisten mikro-organismien pesäkelukumääriä käytetään yleisinä hygieniaindikaattoreina, kun taas *E. coli* -bakteeria pidetään ulostekontaminaation indikaattorina (Evira 2009).

Enterobakteerien raja-arvot esimerkiksi sikojen ruhojen pintahygienialle ovat $m = 2,0 \log \text{ pmy/cm}^2$ ja $M = 3,0 \log \text{ pmy/cm}^2$ (Evira 2009). ETL:n ohjausarvot

kypsille lihavalmisteille niiden viimeisenä käyttöpäivänä ovat $m = 2,0 \log \text{ pmy/g}$ ja $M = 3,0 \log \text{ pmy/g}$ (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Aerobisten mikro-organismien pesäkemäärien raja-arvot sikojen pintahygienialle ovat $m = 4,0 \log \text{ pmy/cm}^2$ ja $M = 5,0 \log \text{ pmy/cm}^2$ ja jauhelihan viimeiselle käyttöpäivälle $m = 7,7 \log \text{ pmy/g}$ ja $M = 8,0 \log \text{ pmy/g}$ (Evira 2009, Elintarviketeollisuusliitto 2017).

Kirjallisuudessa tuoreiden sirkkojen enterobakteerien pesäkelukumääräksi on kuvattu $4,2 - 8,0 \log \text{ pmy/g}$ ja aerobisten mikro-organismien määräksi $7,2 - 8,0 \log \text{ pmy/g}$ (Klunder ym. 2012, Vandeweyer ym. 2016). Sirkoissa onkin siis runsaasti elinvoimaisia bakteereja. Mikrobimäärien vähentäminen voikin olla tarpeellista sirkkoja käsittelemällä, jotta sirkkojen tai sirkkatuotteiden pilaantumista voidaan ennaltaehkäistä. Kirjallisuudessa onkin kuvattu tähän tarkoitukseen sopivia erilaisia menetelmiä. Esimerkiksi Klunder ym. (2012) toteavat tutkimuksissaan, että keittämällä sirkkoja minuutin ajan saadaan enterobakteerien pesäkelukumäärät laskettua alle $1 \log \text{ pmy/g}$ ja aerobisten mikro-organismien pesäkelukumäärää $3,1 \log \text{ pmy/g}$. Keittämällä sirkkoja viiden minuutin ajan saatiin aerobisten mikro-organismien pesäkelukumäärä laskemaan $1,7 \log \text{ pmy/g}$:aan (Klunder ym. 2012). Käsitteilymenetelmät ovat varsin tehokkaita, sillä jo minuutin keittämällä saatiin pesäkelukumäärät laskemaan ETL:n kypsille lihavalmisteille asettamien ohjausarvojen alle (Elintarviketeollisuusliitto 2017).

Myös homeet ja hiivat vaikuttavat elintarvikkeiden säilyvyyteen, vaikka niiden pesäkelukumäärille ei olekaan määritetty laissa mikrobiologisia vaatimuksia (Evira 2009). Tuoreiden kasvien ohjausarvoiksi ETL on määrittänyt homeille $m = 3 \log \text{ pmy/g}$ ja $M = 4,0 \log \text{ pmy/g}$ ja hiivoille $m = 4,0 \log \text{ pmy/g}$ ja $M = 5,0 \log \text{ pmy/g}$, raaoille lihatuotteille ohjausarvoja ei ole määritetty (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Tutkimuksissa homeet ja hiivat on yleensä tutkittu yhdessä ja tuoreista sirkoista pesäkelukumääräksi on saatu $4,8 - 7,2 \log \text{ pmy/g}$ (Vandeweyer ym. 2016, Caparros Megido ym. 2017). Kotisirkoissa on siis runsaasti myös homeita ja hiivoja, mutta niidenkin pesäkemäärät on saatu vähennettyä alle $1 \log \text{ pmy/g}$ neljän minuutin keittämällä (Caparros Megido ym. 2017).

Myös maitohappobakteerit voivat vaikuttaa elintarvikkeiden säilyvyyteen, sillä osa niistä on pilaajabakteereita ja ne ovat merkittävä osatekijä

esimerkiksi lihan pilaantumisessa (Borch ym. 1996). Maitohappobakteerien pesäkelukumäärille ei ole asetettu lakisäateisiä raja-arvoja, mutta joillekin tuotteille löytyy ETL:n asettamat ohjausarvot (Evira 2009, Elintarviketeollisuusliitto 2017). Jauhelihalle ohjausarvoiksi on annettu $m = 7,70 \log \text{ pmy/g}$ ja $M = 8,0 \log \text{ pmy/g}$ (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Sirkoissa maitohappobakteerimäärien on todettu olevan noin $7,4 - 8,1 \log \text{ pmy/g}$ (Vandeweyer ym. 2016). On kuitenkin huomioitava, että pelkkä maitohappobakteerien määrä ei kerro pilaantumisriskistä, vaan on myös tiedettävä mitä lajeja sirkoista löytyy. Jos maitohappobakteereja tunnistetaan pilaajabakteereiksi, pitää bakteerimääriä pyrkiä vähentämään, etteivät pilaajat leviä sirkkojen mukana elintarvikeketjuun.

Maitohappobakteerit eivät kuitenkaan aina ole pelkästään haitallisia pilaajia, sillä niitä voidaan käyttää myös säilönnässä fermentaation herätekantoina. Hyönteisistä esimerkiksi jauhomadon (*Tenebrio molitor*) toukkien säilömistä maitohappobakteereilla onkin tutkittu (Klunder ym. 2012). Maitohappobakteerifermentaatiossa monien bakteerien määrä tuotteessa kasvaa, mutta lopulta lisääntynyt happamuus estää haitallisten mikrobien kasvua (Klunder ym. 2012). Onkin siis myös arvioitava, voidaanko sirkoista luontaisesti löytyviä maitohappobakteereja hyödyntää tuotteiden säilönnässä, vai ovatko maitohappobakteerilajit haitallisia ja tahdotaanko niiden määrää sirkoissa vähentää.

2.6 Sirkkojen mikrobiyhteisöjen tutkimus

Sirkkojen mikrobiyhteisöjä on tutkittu enimmäkseen mikrobiologisilla määrittelyillä, eli sirkkojen mikrobistoa on viljelty eri kasvualustoilla. Kasvualustojen selektiivisyydellä voidaan pyrkiä rajoittamaan, mitä mikrobeja alustoilla kasvaa, jolloin kasvun voidaan ajatella kuvastavan tiettyä mikrobiryhmää. Mikrobien viljelyllä pystytään tehokkaasti määrittämään sirkkojen kantaman mikrobiomin elinkelpoisten mikrobien määrä ja eri mikrobiryhmien suhteelliset osuudet näistä elinkelpoisista bakteereista.

Mikrobiologisella viljelyllä saadaan kuitenkin vain suuntaa-antavaa tietoa koko mikrobiyhteisöstä, sillä kaikki mikrobit eivät kasva valituilla alustoilla ja valituissa oloissa. Esimerkiksi kaikki maitohappobakteerit eivät kasva niiden viljelyyn valitulla MRS-agarilla.

Yleisesti sirkoista on tutkittu ainakin aerobisten mikrobien pesäkelukumäärä, enterobakteerien määrä, maitohappobakteerien määrä ja homeiden ja hiivojen määrä. Aerobisten mikrobien pesäkelukumäärää määritettäessä käytetään ei-valikoivia kasvatusalustoja, jotta mahdollisimman moni mikrobi pystyy kasvamaan alustalla. Usein elatusaineena käytetäänkin Plate Count Agaria (PCA), joka sisältää tryptonia ja hiivauutetta, mikä mahdollistaa useiden bakteerien kasvun alustalla. Enterobakteerit taas viljellään violettipuna-sappi-glukoosi-agarille (VRBG), jossa enterobakteerit kasvavat vaaleanpunaisina tai punaisina pesäkkeinä. Maitohappobakteerien viljelemiseen taas käytetään useimmiten de Man, Rogosa ja Sharpe -agaria (MRS), johon voidaan lisätä amphotersiini B:tä, rajoittamaan hiivojen kasvua maljoilla. Homeita ja hiivoja taas voidaan kasvattaa esimerkiksi oksitetrasykliini-glukoosi-hiivauute-agarille (OGYE), jossa oksitetrasykliini estää bakteerien kasvun.

Bakteerien viljelyllä saadaan kvantitatiivista tietoa siitä, mitä mikro-organismeja esimerkiksi sirkoissa on. Viljelyiden perusteella ei esimerkiksi voida päätellä minkä lajisia tai edes sukuisia bakteereita esimerkiksi maitohappobakteerit tai enterobakteerit ovat, sillä pesäkkeiden ja bakteerien tunnistaminen fenotyyppien perusteella ei ole kovin tarkkaa, mutta se on hyvinkin työlästä. Siksi mikrobiyhteisöjen tutkimuksissa käytetään usein myös viljelystä riippumattomia molekyylibiologisia menetelmiä, kuten bakteerit sukutasolle tunnistavaa 16S rRNA-amplikonin sekvenssianalyysiä. Menetelmällä saadaan kartoitettua koko bakteeriyhteisö, sillä geenin löytyy kaikista bakteereista ja lisäksi arkeoneista. Sekvensoimalla geenin vaihtelevia eli V-alueita ja vertaamalla tuloksia tietokantojen tunnettuihin sekvensseihin, voidaan bakteereja tunnistaa ja erottaa toisistaan. Bakteerilajit kuitenkin tunnistetaan geenin samanlaisuudesta johtuen lajitasolle vain harvoin, ja tunnistuksen taso vaihtelee sukutasosta joskus vain pääjaksoon.

Esimerkiksi maitohappobakteereita tahdotaan kuitenkin usein tunnistaa myös lajitasolle asti, jotta tiedetään ovatko kyseiset kannat elintarvikehygienian kannalta merkityksellisiä ja mitkä ovat maitohappobakteerien valtalajeja. Tätä varten maitohappobakteereille voidaankin tehdä 16S ja 23S rRNA:n geenirestriktioanalyysi, eli ribotyypitys, joka on todettu tehokkaaksi keinoksi tunnistaa ruokaketjun maitohappobakteereita ja sitä onkin käytetty menestyksekkäästi useissa tutkimuksissa

maitohappobakteerien tunnistamiseen (Björkroth & Korkeala 1997, Björkroth ym. 2000, Björkroth ym. 2002). Ribotyyppityksessä maitohappobakteeri-isolaatista eristetään DNA ja sen 16S ja 23S rRNA:ta koodaavasta geenistä tehdään geenirestriktiolla ja elektroforeesilla ”sormenjälkikuvio”. Tätä sormenjälkeä verrataan tyyppikantojen sormenjälkikuvioihin ja niiden avulla muodostetaan dendrogrammi, josta voidaan päätellä mitä bakteerilajia isolaatti on.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITE

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää elintarvikkeeksi kasvatettujen kotisirkkojen tyypillisen mikrobiyhteisön rakenne, saada tietoa eri mikrobiryhmien pesäkelukumääristä ja tunnistaa sirkoissa esiintyvien maitohappobakteerien valtalajeja.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Kotisirkat, näytteenotto ja homogenisointi

Elintarvikekelpoiseksi kasvatettuja kotisirkkoja (*Acheta domesticus*) noudettiin suomalaiselta kasvattamolta. Kotisirkkoja otettiin näytteeksi kasvattamon eristä ja osaa sirkoista oli paastotettu 24 tuntia ennen keräämistä. Paastoamattomia näytteitä tuli yhteensä kymmenestä erästä ja paastonneita näytteitä viidestä erästä.

Paastoamattomat sirkat oli lopetettu pakastamalla jo sirkkakasvattamolla, kun taas paastonneet näytteet keräsimme elävinä.

Pakastettuja sirkkoja säilytettiin -20 °C:n lämpötilassa ja ne sulatettiin huoneenlämmössä noin 30 minuutin ajan. Elävät sirkat paastotetuista eristä jäähdytettiin horrokseen jääkaapissa ja tapettiin pakastamalla -20 °C:ssa noin puolen tunnin ajan ennen tutkimuksen aloittamista.

Näytteeksi punnittiin 10-25 g sirkkoja kustakin erästä. Näyte homogenoitiin peptonisuolaliuokseen (0,9 % peptonia, 0,85 % NaCl) Stomacher -sekoittajalla (Seward, Iso-Britannia) noin 10 sekunnin ajan.

4.2 Bakteeriyhteisön rakenteen selvittäminen 16S rRNA-geenin amplikonisekvenssianalyysiin perustuen

4.2.1 DNA:n eristys

Mikrobi-DNA eristettiin näytehomogenaateista fenoli-kloroformi-uutto-menetelmällä kuten aiemmin kuvattu tutkimuksessa (Hultman ym. 2015). Homogenaateista poistettiin ensin suuret kappaleet sentrifugoimalla matalalla nopeudella (200g, 3 min), jonka jälkeen supernatantti sentrifugoitiin uudestaan suuremmalla nopeudella (10 000g, 3min), jotta mikrobisolut saatiin pohjalle, ja supernatantti poistettiin. Solunappia säilytettiin -20 °C:n lämpötilassa DNA:n eristykseen asti.

Solunapit sulatettiin ja niihin lisättiin proteiinien denaturoimiseksi fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholia ja denaturaatiopuskuria. Natriumasetaattia lisättiin DNA:n saostamiseksi. Solut siirrettiin kuulaputkiin (Lysing Matrix E, MP Biomedicals, USA) ja solut rikottiin kuulamylyssä (FastPrep-24, MP Biomedicals, USA). Putkia pidettiin jäähauteessa ja putket sentrifugoitiin (13 000 rpm, 4 min, 4 °C) proteiinien poistamiseksi. Supernatantti siirrettiin kloroformiin ja putket sentrifugoitiin uudestaan (13 000 rpm, 4 min, 4 °C) fenolin poistamiseksi. Supernatantti otettiin talteen ja siinä oleva DNA saostettiin etanolilla ja värjättiin Glycoblue-värillä. Seoksen inkuboinnin jälkeen DNA:sta muodostettiin nappi sentrifugoimalla (13 200 rpm, 20 min, 4 °C) ja se pestiin etanolilla. Putket sentrifugoitiin uudestaan (13 200 rpm, 5 min, 4 °C), etanoli poistettiin ja DNA liuotettiin steriiliin veteen ja DNA:n määrä ja laatu mitattiin spektrofotometrillä (Nanodrop ND-1000, USA).

4.2.2 16S rRNA geenin -amplikonisekvenssianalyysi

16S rRNA geenin -amplikonisekvenssianalyysi ostettiin palveluna Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin DNA:n sekvensointi ja genomiikan laboratoriolta. Sekvensointi tehtiin Biotekniikan Instituutin internetsivuilta löytyvän protokollan mukaisesti (Biotekniikan instituutti). Lyhyesti kuvattuna menetelmä sisältää seuraavat vaiheet: Mikrobiomin tunnistamiseksi 16S rRNA-geenin V1-V3 alueita monistettiin PCR-reaktiolla käyttäen sopivia alukkeita. PCR-reaktion jälkeen tuotteet puhdistettiin ja laimennettiin puskuriin, minkä jälkeen PCR-tuotteisiin lisättiin sekvensointiadapterit ja tunnisteet toisessa PCR-reaktiossa. PCR-tuotteet puhdistettiin uudestaan, sekvenssien laatu arvioitiin ja huonolaatuiset ja liian lyhyet kappaleet hylättiin. Saatuja "OTU:ja" (Operation taxonomic unit) verrattiin tietokantaan ja ne tunnistettiin samankaltaisuuden perusteella tietylle taksonomiselle tasolle. OTU:t yhdistettiin näytteisiin niissä olevien näytekohtaisten tunnisteiden perusteella.

4.3 Bakteeritasojen määrittäminen mikrobiologisin menetelmin

Näytehomogenaatista tehtiin laimennossarja peptonisuolaliuokseen, ja sopivia laimennoksia siirrostettiin eri kasvualustoille ja inkuboitui vakiintuneiden käytäntöjen mukaisissa olosuhteissa (Taulukko 2). Pesäkkeet laskettiin mahdollisuuksien mukaan maljoilta, joissa kasvoi 10 – 250 pesäkettä.

Taulukko 2 Määritettävät mikrobiryhmät ja elatusaineet

MIKROBIRYHMÄ	KASVATUSALUSTA	INKUBOINTIOLOSUhteET	VILJELY- TEKNIikka
Enterobakteerit	VRBG ¹	30 °C, aerobinen, 24h	Maljavalu
Lämpökestoiset koliformiset bakteerit	VRB ¹	44°C, aerobinen, 24h	Maljavalu
Maitohappobakteerit	MRS ¹	25°C, anaerobinen ² , 4-5vrk	Pintalevitys
Aerobiset mikro- organismit	PCA ¹	30°C, aerobinen, 2-3vrk	Maljavalu
Homeet ja hiivat	OGYE ¹	25°C, aerobinen, 4-5vrk	Pintalevitys

¹Valmistaja: Oxoid Ltd, Basingstoke, UK

²Kolvissa, Anaerogen-pusseja (Oxoid, UK) hyödyntäen

4.4 Maitohappobakteerien tunnistaminen *HindIII*-ribotyyppiin perustuen

Maitohappobakteerien tunnistus tehtiin pääpiirteissään kuten kuvattuna tutkimuksessa (Vihavainen ym. 2008). Koettimina käytettiin bakteerien 16S ja 23S rRNA -geeneihin kiinnittyvien viiden koettimen seosta (Regnault ym. 1997). Lasketuilta MRS-maljoilta valitut tyypillisen näköiset pesäkkeet siirrostettiin MRS-liemeen, josta tehtiin puhtasviljelmä MRS-maljalle. Maljoilta tehtiin katalaasitesti ja negatiiviset isolaatit siirrostettiin MRS-liemeen, josta solut eristettiin sentrifugoimalla. Kannat säilöttiin -70 °C:n lämpötilaan MRS-liemessä. Katalaasi-positiivisiksi osoittautuneiden isolaattien analyysiä ei jatkettu.

Solut hajotettiin Lysozyymi-Mutanolyysi-TE10:1-RNAasi-liuoksella ja proteiinit denaturoitiin GES-reagenssilla ja ammoniumasetaatilla. Putkiin lisättiin kloroformi-2-pentanolia, ja putket sentrifugoitiin (13 000 rpm, 10 min) proteiinien poistamiseksi. DNA:n sisältävä supernatantti otettiin talteen ja siihen lisättiin isopropanolia, jolla DNA saatiin näkyviin. DNA sentrifugoitiin (13 000 rpm, 4 min) putkien pohjalle, isopropanoli poistettiin ja DNA pestiin 70 % etanolilla kolmeen kertaan. Lopuksi etanoli poistettiin ja kuiva DNA säilytettiin -20 °C:n lämpötilassa. Ennen analysoinnin jatkamista DNA liuotettiin steriiliin veteen ja sen konsentraatio ja puhtaus mitattiin spektrofotometrillä (Nanodrop ND-1000, USA).

DNA laimennettiin veteen ja siihen lisättiin restriktioentsyymien puskuri ja restriktioendonukleasi-entsyymi, joka pilkkoi eli digestoi DNA:n 37 °C lämpötilassa kahden tunnin ajan. Tämän jälkeen putkiin lisättiin väriainetta, joka auttaa näytteiden pipetoimisessa elektroforeesigeeliin. Digestit pipetoitiin etidumbromidilla värjättyyn iDNA-agarosin kaivoihin ja verrokiksi osaan kaivoista pipetoitiin molekyylipainomarkkeria. Näytteitä ja markkereita ajettiin geelissä 25 voltin jännitteellä 16 tunnin ajan, mikä erottelee erikokoiset DNA-kappaleet toisistaan.

Elektroforeesin jälkeen DNA-kappaleet siirrettiin geelistä nylonmembraanille vakuumsiiirtolaitteella. DNA:sta poistettiin puriiniemäkset, DNA denaturoitiin yksijuosteiseksi ja geeli neutralisoitiin ja lopulta DNA:n kappaleet siirrettiin geelistä membraanin pintaan. Membraani kuivattiin ja DNA kiinnitettiin sen pintaan UV-uunissa.

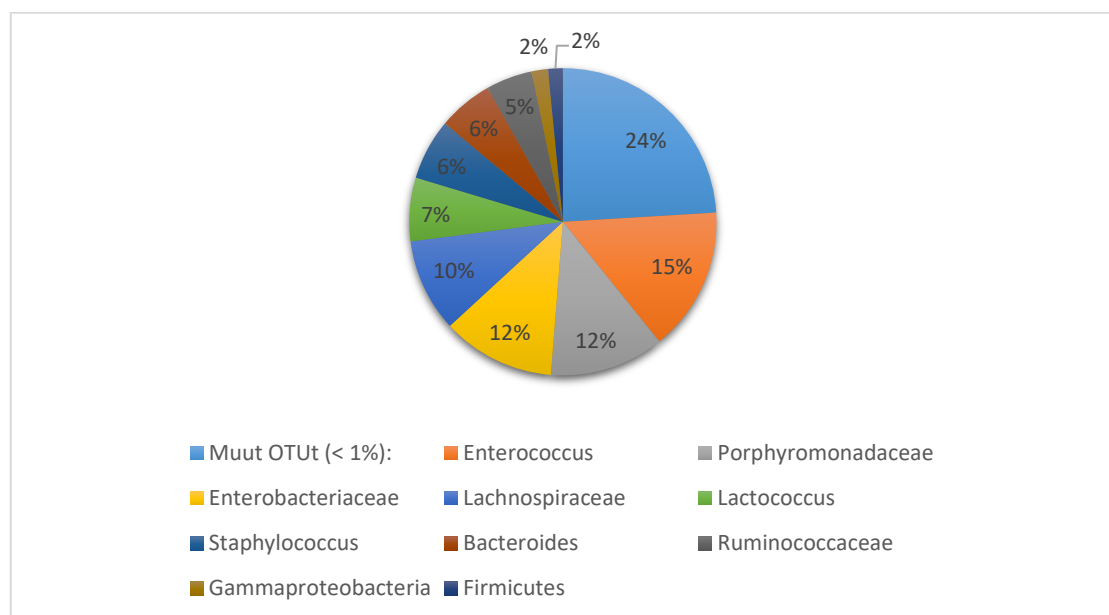
Membraanit esihybridisoitiin, jotta DNA-koettimet eivät tartu membraanin pintaan ja sen jälkeen tehtiin varsinainen hybridisointi, jossa DNA-koettimet tarttuvat membraanilla olevaan komplementaariseen DNA:han. Irralliset koettimet pestiin pois ja membraanien päälle lisättiin Anti-digoxigeniini-konjugaatti, joka tarttuu DNA-koettimissa olevaan digoksiinileimaan. Membraanit huuhdeltiin ja niiden päälle lisättiin värjäysliuos, joka reagoi vasta-aineessa kiinni olevan AFOS-entsyymin kanssa ja värjää membraanin pinnan. Näin DNA-juosteiden sormenjälkikuvio muodostuu näkyviin. Tämän jälkeen membraanit huuhdeltiin ja kuivattiin.

Kuivat membraanit skannattiin ja syötettiin BioNumerics - tietokoneohjelmaan, jossa kantojen *HindIII*-ribotyyppejä voidaan verrata tietokantaan tallennettujen maitohappobakteerityyppikantojen ribotyyppeihin. Vertailu tehtiin luomalla tuloksista dendrogrammi, jossa samankaltaiset ribotyypit ryvästyvät rinnakkain ja ribokuvioiden laskennallinen samankaltaisuus havainnollistuu.

5 TULOKSET

5.1 16S rRNA-amplikonien sekvenssianalyysi

Sekvensoitavaksi lähetettiin eristetty mikrobi-DNA seitsemästätoista sirkanäytteestä. Näytteistä saatujen hyväksytyjen sekvenssipätkien eli ”readien” määrä vaihteli näytteissä välillä 36 032 – 178 155. Yhteensä ”readeja” saatiin 1 715 462 kappaletta. Tiettyä ”OTU:a” (Operational taxonomic unit) edustavien ”readien” suhteellinen osuus laskettiin joka näytteestä. OTU:t, joiden osuus kaikissa näytteissä oli alle 1 % yhdistettiin ryhmäksi Muut OTU:t. Koska readeja saatiin näytteistä niin vaihtelevasti, laskettiin eri bakteeriryhmien OTU:jen suhteelliset osuudet joka näytteessä, minkä jälkeen näistä osuuksista laskettiin keskiarvot. OTU:jen suhteellisten osuuksien keskiarvot on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. OTU:jen keskimääräiset osuudet sirkanäytteissä. Samaan taksonomiseen tasoon tunnistetut OTU:t on yhdistetty ryhmiksi ja OTU:t, joiden osuus on alle 1 % on yhdistetty Muut OTU:t -ryhmään.

Kokonaisuudessa yleisimpiä olivat *Enterococcus* -suvun ja *Porphyromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*- ja *Lachnospiraceae* -heimojen OTU:t. Näytekohtaisesti OTU:jen osuuksissa oli kuitenkin suuria eroja, ja osassa paastoamattomista näytteistä *Staphylococcus* -suvun OTU:t muodostivat enemmistön jopa 29 %:n osuudella. Useista sirkanäytteistä löytyi pieni osuus (<1 %) OTU:ja jotka tunnistuivat *Listeria* -suvun bakteereiksi. Sirkanäytteistä ei kuitenkaan löytynyt OTU:ja jotka olisivat tunnistuneet *Salmonella*, *Escherichia* tai *Campylobacter* -lajeiksi.

5.2 Mikrobiologiset määritykset

Pesäkelukumäärät määritettiin yhteensä viidestätoista eri sirkanäytteestä. Näytteistä 10 kpl otettiin paastoamattomista sirkoista ja 5 kpl sirkoista, jota olivat paastonneet 24h ennen keräämistä. Mikrobiologisten määritysten tulosten keskiarvot on esitetty taulukossa 3. Näytekohtaiset mikrobiologisten määritysten tulokset löytyvät liitteestä 1.

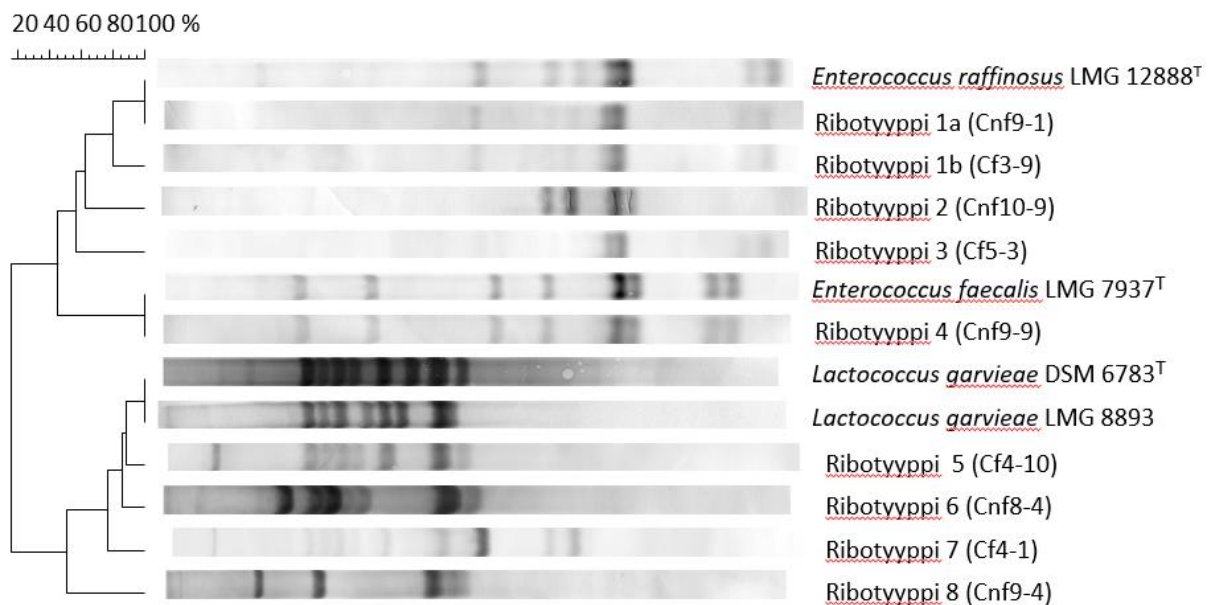
Taulukko 3. Mikrobiologisten määritysten tulokset¹

Mikrobiryhmä	Pesäkelukumäärä (log pmy/g)	
	Paastoamattomat sirkat	Paastonneet sirkat
Aerobiset mikro-organismit	8,17 ± 0,50	8,90 ± 0,54
Enterobakteerit	5,58 ± 0,70	6,52 ± 0,35
Koliformiset bakteerit, 44 °C	4,24 ± 0,94	7,71 ± 1,38
Maitohappobakteerit	7,72 ± 0,21	7,89 ± 0,11
Homeet ja hiivat	4,48 ± 1,03	5,35 ± 0,41

¹Tulosten keskiarvo ± keskihajonta

5.3 Maitohappobakteerien ribotyypitys

Sirkkanäytteistä eristettiin yhteensä 72 maitohappobakteeri-isolaattia, joista 39 kpl oli paastoamattomista sirkoista ja 33 kpl paastonneista sirkoista. Isolaateista 13 kappaletta tunnistettiin *Enterococcus raffinosukseksi* (ks. Kuva 2, Ribotyyppi 1), 2 kappaletta *Enterococcus faecalikseksi* (Ribotyyppi 4) ja 9 kappaletta *Lactococcus garvieaeksi* (Ribotyyppi 5). Isolaateista 48:a ei pystytty tunnistamaan lajitasolle ribotyyppikirjaston avulla. Näistä 19 kappaletta kuitenkin ryhmittyi enterokokkityypikantojen rinnalle ja niiden *HindIII*-ribotyyppi muistutti enterokokeille tyypillistä kuviota (Ribotyypit 2 ja 3). Neljä isolaattia taas ryhmittyi lähelle laktokokkityypikantoja (Ribotyyppi 6). 25 isolaattia jäi kokonaan tunnistamatta.



Kuva 2. Osa ribotyyppityksessä käytettyä dendrogrammia. Puu tehty etäisyyksiin perustuvan unweighted pair-group (UPGMA) -metodin avulla. Samankaltaisuutta verrattu Dice –kaavalla; optimisaatio 1,5 % ja toleranssi 1,5 %. Mukana vain ribotyypit, joita esiintyi aineistossa useammin kuin kerran.

6 POHDINTA

6.1 Sirkkojen mikrobiyhteisöt

Sirkkojen mikrobiyhteisö koostuu tulosten perusteella hyvin laajasti eri sukujen bakteereista. Suurimman osan bakteeriyhteisöstä muodostavat oletettavasti sirkkojen suoliston mikrobit, sillä kirjallisuuden mukaan niin *Enterococcus*-, *Porphyromonadaceae*-, *Enterobacteriaceae*-, *Lachnospiraceae*-, *Bacteroides*- kuin *Ruminococcaceae*-bakteereistakin suuri osa on ainakin nisäkkäillä suolistobakteereja (Biddle ym. 2013, Octavia & Lan 2014, Sakamoto 2014, Stackebrandt 2014, Švec & Franz, 2014, Wexler 2014). Monet *Enterococcus*-suvun ja *Enterobacteriaceae*-heimon lajeista ovat kuitenkin erittäin yleisiä myös ympäristössä, joten niitä ei voida laskea suoraan suolistobakteereiksi (Švec & Franz, 2014, Octavia & Lan 2014). *Staphylococcus*- ja *Lactococcus*-lajien taas on kuvattu olevan ainakin nisäkkäillä enimmäkseen osa ihon mikrobiomia ja joitain *Lactococcus*-suvun bakteereja on löydetty myös kasveissa (Kloos 1980, Casalta & Montel 2008). Paaston vaikutusta mikrobiyhteisön rakenteeseen ja mikrobien määrään onkin tarpeellista tutkia, jotta sen hyödyllisyyttä voidaan arvioida. Tässä tutkimuksessa paaston vaikutusta ei voitu arvioida näytemäärien vähyyden ja eripituisten pakastajaksojen takia.

Sirkkojen mikrobiyhteisöjen rakennetta on tutkittu hyvin niukasti ja varsinkin käsittelemättömien sirkkojen mikrobiyhteisöistä on vain vähän tietoa. Garofalo ym. (2017) tutkivat kuitenkin kuivattujen ja jauhettujen kotisirkkojen mikrobiyhteisöjä 16S rRNA geenin-amplikonien sekvenssianalyysiä käyttäen. Heidän tutkimuksissaan kuivattujen sirkkojen valtalajeja olivat *Enterobacteriaceae*- (33 %), *Ruminococcaceae*- (13,4 %) ja *Lachnospiraceae*-heimoihin (10,9 %) ja *Bacteroides*-sukuun (10,4 %) kuuluvat bakteerit. Jauhetuissa sirkoissa valtalajit kuuluivat *Ruminococcaceae*- (18,1 %), *Enterobacteriaceae*- (17,5 %) ja *Pseudomonadaceae*- (9,3 %) heimoihin ja *Lactococcus garvieae* oli yksi valtalajeista 14,0 % osuudella OTU:ista (Garofalo ym. 2017). Garofalon ym. (2017) tutkimuksessa valtalajit kuuluvat siis samoihin heimoihin ja sukuihin kuten tässäkin tutkimuksessa, mutta valtaheimojen ja -lajien suhteellisissa osuuksissa on kuitenkin kohtalaisesti eroja. Nämä erot voivat

kuitenkin selittyä sillä, että tässä tutkimuksessa sirkat olivat käsittelemättömiä ja Garofalo ym. (2017) käyttivät kuivattuja ja kuivaamisen jälkeen jauhettuja sirkkoja.

Listeria -suvun bakteerien löytyminen näytteistä ei vielä kerro, että näytteissä olisi patogeenistä *L. monocytogenes*, sillä OTU:ja ei tunnistettu lajitasolle asti. Siitä, ettei menetelmällä löydetty muiden patogeenisten tai haittamikrobien OTU:ja, voidaan päätellä, että ne eivät kuulu sirkkojen valtamikrobistoon. Jos patogeenisiä bakteerien löytymistä halutaan tutkia tarkemmin, pitää tutkimuksiin käyttää herkempiä seulontamenetelmiä, kuten Salmonellan tunnistusta PCR:llä (Bennett ym. 1998). Tulokset ovat kuitenkin linjassa muiden nykytutkimusten kanssa, sillä elintarvikkeeksi kasvatetuista sirkoista ei ole pystytty osoittamaan *Salmonella*-, *L. monocytogenes* -bakteereita (Vandeweyer ym. 2016).

6.2 Mikrobiein pesäkelukumäärät

Sekä paastonneissa että paastoamattomissa sirkoissa aerobisten mikro-organismien ja maitohappobakteerien pesäkelukumäärät olivat hyvin korkeita, mikä kertoo sirkoissa olevan suuri määrä elinkelpoisia mikrobeja. Tulokset ovatkin melko hyvin linjassa muiden raportoitujen tutkimusten kanssa, sillä esimerkiksi aerobisten mikro-organismien määräksi on kuvattu kirjallisuudessa 7,2 – 8,0 log pmy/g (Klunder ym. 2012, Vandeweyer ym. 2016) ja maitohappobakteerien pesäkelukumääräksi noin 7,4 – 8,1 log pmy/g (Vandeweyer ym. 2016). Myös kirjallisuudessa kuvatut enterobakteerien pesäkelukumäärät 4,2 – 8,0 log pmy/g (Klunder ym. 2012, Vandeweyer ym. 2016) sekä homeiden ja hiivojen pesäkelukumäärät 4,8 – 7,2 log pmy/g (Vandeweyer ym. 2016, Caparros Megido ym. 2017) vastaavat hyvin tässä tutkimuksessa saatuja arvoja.

Verrattuna taas jauhelihalle asetettuihin mikrobivaatimuksiin, ylittävät sallitut pesäkelukumäärien rajat selvästi, sillä ylempänä rajana jauhelihan aerobisille mikro-organismeille on log 6,70 pmy/g (Komission asetus (EY) N:o 2073/2005, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista). Lukemat ovat myös suurempia kuin ETL:n suositukset jauhelihan aerobisten mikrobiein määrästä tuotteen viimeisenä käyttöpäivänä, oli kyseessä sitten raaka jauheliha tai kypsennetty jauhelihatuote (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Myös enterobakteerien määrät ylittävät esimerkiksi

ruhojen pintahygienialle sallitut rajat niin paastonneissa, kuin paastoamattomissakin sirkanäytteissä (Komission asetus (EY) N:o 2073/2005, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista).

Määritetyistä mikrobiryhmistä selvästi suurimmat määrät näytteissä oli maitohappobakteereja, joiden määrät asettuvat jauhelihaan verrattaessa ETL:n alemman ja ylemmän ohjearvon väliin (Elintarviketeollisuusliitto 2017).

Maitohappobakteereissa määrän lisäksi on tärkeää tietää myös niiden lajikirjo, jotta voidaan arvioida niiden vaikutusta tuotteiden pilaantumiseen.

Maitohappobakteeripesäkkeiden jatkotutkimukset osoittivat, että MRS-maljoilla kasvoi myös katalaasipositiivisia mikrobeja, viitaten että maljoilla kasvoi suurina lukumäärinä myös muita kuin maitohappobakteeriryhmän organismeja. Tämä on tulevaisuudessa otettava huomioon, jos halutaan selvittää maitohappobakteerien määrää.

Lämpökestoisten koliformisten bakteerien määrittämisessä suuren ongelman aiheutti maljoilla kasvava tausta, joka vaikeutti tyypillisten pesäkkeiden laskemista. Varsinkin paastonneissa sirkoista otetuista näytteissä, joita oli säilytetty pakastimessa huomattavasti lyhyemmän aikaa, koliformisten bakteerien määrittäminen oli lähes mahdotonta maljojen ylikasvusta johtuen. Siksi paastonneista sirkoista otetuista näytteistä vain yhdestä (CF-1) saatiin määritettyä luotettavasti koliformisten bakteerien pesäkelukumäärä.

Homeiden ja hiivojen määrät ylittivät sekä kypsille jauhelihavalmisteille, että tuoreille kasviksille määritetyt ohjausarvot viimeisenä käyttöpäivänä (Elintarviketeollisuusliitto 2017). Käsittelemättömien sirkojen vertaaminen tuoreisiin kasviksiin voisikin olla perusteltua, sillä molemmat sisältävät luonnostaan suuren määrän mikro-organismeja.

Saadut tulokset ovat hyvin linjassa aiemmissa tutkimuksissa saatujen tulosten kanssa. Elintarvikkeeksi kasvatetuissa sirkoissa on suuri määrä elinkelpoisia bakteereja ja mikrobiologisten vaatimusten asettaminen prosessoimattomille sirkoille on hyvin hankalaa. Siksi onkin jatkossa tutkittava, kuinka erilaisilla prosessointimenetelmillä pystytään vähentämään mikrobimäärää, ja kuinka

mikrobimäärät vaikuttavat lopputuotteen säilyvyyteen ja laatuun. Mikrobiologiset vaatimukset ja ohjausarvot ovatkin näiden tietojen perusteella järkevämpää määrittää prosessoiduille tuotteille.

6.3 Maitohappobakteerien valtalajit

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella enterokokit ovat maitohappobakteeriyhteisön valtalajeja. Enterokokit ovatkin tutkimusten perusteella hyvin yleisiä hyönteisten suolistobakteereja ja niitä löytyy varsinkin meheviä kasvinosia syövien hyönteisten, kuten sirkkojen, suolistosta (Martin & Mundt 1972). Enterokokeilla onkin arvioitu olevan tärkeä rooli monien hyönteisten ruoansulatuksessa, sillä niitä on löydetty myös useiden haitallisia aineita sisältäviä kasveja syövien hyönteisten ruoansulatuskanavasta (Vilanova ym. 2016).

Enterokokit ovat myös hyvin yleisiä ihmisten suoliston kommensaalibakteereja, ja niitä löytyy melkein kaikkien ihmisten suolistosta ja ulosteesta. Ne ovat myös opportunistisia patogeeneja (Megran 1992) ja niillä on havaittu mikrobilääkeresistenssiä (Hayes ym. 2003, Kawalec ym. 2007). Enterokokit ovat myös yleisiä bakteereja maito- ja lihatuotteissa, ja ne kolonisoivat niitä useimmiten ympäristön tai ulostekontaminaation kautta (Giraffa 2002). Osalla enterokokeista merkittävä ominaisuus on myös niiden lämmönkestokyky, minkä ansiosta ne voivat jopa selvitä pastöroinnista (Houben 1982). Elintarvikkeista löytyy useimmiten muita kuin patogeenisia ja resistenttejä enterokokki-kantoja ja enterokokkeja pidetäänkin elintarvikkeissa yleisesti turvallisina (Hugas ym. 2003). On kuitenkin suositeltu, että esimerkiksi probiootteina tai elintarvikkeiden fermentaatiossa käytettävät bakteerikannat tutkittaisiin virulenssitekijöiden varalta, jotta patogeenisia kantoja vältettäisiin käyttämästä (Eaton & Gasson 2001).

Lienee kuitenkin mahdollista, että ravinnosta suolistoon saatu mikrobilääkeresistentti bakteeri voi toimia myöhemmin taudinaiheuttajana. Voisikin olla tärkeää kartoittaa tarkemmin millaisia enterokokkikantoja sirkoissa on ja löytyykö niistä mahdollisesti mikrobilääkeresistenssiä. Tällä hetkellä tietoa aiheesta sirkkojen kohdalla on hyvin niukasti. Sirkoista luonnollisesti löytyvien enterokokkien käyttö

maitohappofermentaatioissa voi olla mahdollista, mutta toisaalta myös niiden mahdollinen selviäminen pastöroinnista ja pilaajana toimiminen on otettava huomioon.

Maitohappobakteerien valtalajeihin kuuluvat tulosten perusteella myös *Lactococcus* -suvun bakteerit ja varsinkin *Lactococcus garvieae*, mikä on hyvin linjassa myös aiempien tutkimusten tulostan kanssa. Garofalo ym. (2017) havaitsivat tutkimuksessaan, että kuivatuissa ja jauhetuissa kotisirkoissa *Lactococcus garvieae* oli erittäin yleinen bakteeri, muodostaen jopa 14 % osuuden mikrobien OTU:ista. Myös elintarvikkeeksi myydyissä kulkusirkoissa (*L. migratoria migratorioides*) *Lactococcus* -suvun bakteerien on todettu muodostavan jopa neljänneksen mikrobien OTU:ista (Stoops ym. 2016). Laktokokit saattavatkin olla osa sirkkojen pinnan mikrobiyhteisöä, sillä nisäkkäillä laktokokit ovat usein osa ihon mikrobiyhteisöä (Casalta & Montel 2008). Ne saattavat myös olla peräisin sirkoille tarjottavasta ravinnosta, sillä laktokokkeja tavataan jonkin verran myös kasveissa (Casalta & Montel 2008).

Laktokokit ovat hyvin yleisiä bakteereja myös maitotuotteissa (Casalta & Montel 2008). Niitä käytetäänkin paljon meijeriteollisuudessa fermentaatioissa ja niitä pidetään yleisesti ihmisille turvallisina (Beresford ym. 2001, Casalta & Montel 2008). *Lactococcus garvieae* on kuitenkin useiden kalojen patogeeni ja se aiheuttaa esimerkiksi kirjolohissa hemorragista septikemiaa (Vendrell ym. 2006). Tästä johtuen löydös on merkittävä, jos sirkkoja meinataan käyttää aineksena kalojen rehussa, sillä patogeeneja ei haluta levittää kasvatuslaitoksille rehujen mukana.

Tuloksista ilmenee myös ongelma, ettei *HindIII*-entsyymillä tehdyllä ribotyypityksellä pystytä tunnistamaan enterokokkeja lajitasolle asti niiden samankaltaisuuksien vuoksi. Enterokokkien lajintunnistusta varten pitäisikin tehdä esimerkiksi ribotyypitys useammalla endonukleaasientsyymillä tai mieluummin sekvensoida niiden *rpoA*- tai *pheS*-geenejä, joiden avulla on saatu tunnistettu hyvin läheisiäkin enterokokkilajeja toisistaan (Rahkila ym. 2011). Kokonaan tunnistamatta jääneet lajit ovat voineet olla muitakin kuin maitohappobakteereita. Ongelman aiheuttaa se, että MRS-maljat eivät ole täysin selektiivisiä ja niillä kasvaa muitakin mikrobeja.

6.4 Johtopäätökset

Tämän tutkimuksen tulosten perusteella ruokakäyttöön kasvatettavien sirkkojen mikrobiyhteisö koostuu laajasti eri bakteerilajeista ja mikrobiyhteisöstä suuri osa on todennäköisesti sirkkojen suolistobakteereja. Maitohappobakteerit ovat sirkkojen valtalajeja ja niistä yleisimpiä ovat ainakin *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus faecalis* ja *Lactococcus garvieae*. Yleisimmät maitohappobakteerilajit ovat yleisesti todettu ihmisille turvallisiksi elintarvikkeissa, mutta niiden merkitystä ruoka- ja rehuketjussa on tarpeellista tutkia lisää. Myös eri mikrobiyhteisöjen ja mikrobien vaikutusta sirkkojen terveyteen, kasvuun ja hyvinvointiin kannattaa selvittää lisää.

Elinkelpoisten mikrobien määrät tuoreissa sirkoissa ovat hyvin suuria, joten niiden käsitteleminen bakteerien vähentämiseksi on tarpeen, jotta niistä saadaan mikrobiologialtaan hyväksyttäviä elintarvikkeita. Indikaattorimikrobien osalta mikrobiologisten vaatimusten ja ohjausarvojen asettaminen ei kuitenkaan ole helppoa tai edes perusteltua käsittelemättömille sirkoille, vaan ne kannattaa määrittää sirkoista prosessoiduille tuotteille. Tuoreita sirkkoja ja käsiteltyjä sirkkatuotteita on kuitenkin kannattavaa tutkia myös aistinvaraisesti, jotta mikrobimäärien vaikutusta säilyvyyteen voidaan arvioida. Raaoilta sirkoilta voidaan kuitenkin vaatia esimerkiksi salmonellavapautta, jota vaaditaan myös kaikilta lihatuotteilta.

KIITOKSET

Haluan kiittää Elina Sädettä aktiivisesta ja perusteellisesta ohjauksesta kirjoitusprosessin ja mikrobiologisten määritysten aikana. Lisäksi haluan kiittää Henna Niinivirtaa avusta ja opetuksesta molekyylibiologian laboratoriotöissä. Kiitokset myös kaikille elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden kesäkoulun järjestäjille ja mukana olleille opiskelijoille hyvästä ilmapiiristä ja tuesta kesäkoulun aikana.

Haluan myös kiittää yhteistyöstä sirkkakasvattamoa, jolta saimme näytteet tutkimusta varten. Tämä lisensiaatintutkielma toteutettiin osana ruokasirkkojen mikrobiomeja kartoittavaa hanketta (2017-2018), joka toteutetaan Suomen Eläinlääketieteen säätiöltä saadulla tutkimusapurahalla.

LÄHDEKIRJALLISUUS

ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety). Opinion on the use of insects as food and feed and the review of scientific knowledge on the health risks related to the consumption of insects. *Arq Neuro-Psiquiat* 2014, 72: 742.

Bennett AR, Greenwood D, Tennant C, Banks JG, Betts RP. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Lett Appl Microbiol* 1998, 26: 437-441.

Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 2001, 11: 259-274.

Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in diverse gut communities. *Diversity* 2013, 5: 627-640.

Biotekniikan instituutti, Helsingin Yliopisto
http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/dnagen/sequencing_service.htm , haettu 27.7.2017.

Björkroth KJ, Korkeala HJ. Use of rRNA gene restriction patterns to evaluate lactic acid bacterium contamination of vacuum-packaged sliced cooked whole-meat product in a meat processing plant. *Appl Environ Microbiol* 1997, 63: 448-453.

Björkroth KJ, Geisen R, Schillinger U, Weiss N, De Vos P, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66: 3764-3772.

Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, 52: 141-148.

Borch E, Kant-Muermans M, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol* 1996, 33: 103-120.

Casalta E, Montel M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int J Food Microbiol* 2008, 126: 271-273.

Caparros Megido R, Desmedt S, Blecker C, Bera F, Haubruge E, Alabi T, Francis F. Microbiological Load of Edible Insects Found in Belgium. *Insects* 2017, 8: 10.3390/insects8010012.

Caparros Megido R, Sablon L, Geuens M, Brostaux Y, Alabi T, Blecker C, Drugmand D, Haubruge r, Francis F. Edible insects acceptance by Belgian consumers: promising attitude for entomophagy development. *J Sens Stud* 2014, 29: 14-20.

Clifford CW, Woodring JP. Methods for rearing the house cricket, *Acheta domesticus* (L.), along with baseline values for feeding rates, growth rates, development times, and blood composition. *J Appl Entomol* 1990, 109: 1-14.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67: 1628-1635.

EFSA Scientific Committee. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal* 2015.

Elintarviketeollisuusliitto 2017. Elintarvikkeiden mikrobiologisia ohjausarvoja viimeisenä käyttöpäivänä. <http://www.etl.fi/media/aineistot/suosituksset-ja-ohjeet/suositus-2017-elintarvikkeiden-mikrobiologisia-ohjausarvoja-viimeisena-kayttopaivana-id-41101.pdf> , haettu 4.9.2017.

Evira (Evira 2009). Elintarvikkeiden mikrobiologiset vaatimukset, komission asetuksen (EY) No 2073/2005 soveltaminen. [https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/julkaisut/opaat/elintarvikkeiden mikrobiol vaatimukset eviran ohje 10501_1 fi.pdf](https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/julkaisut/opaat/elintarvikkeiden_mikrobiol_vaatimukset_eviran_ohje_10501_1_fi.pdf) , haettu 18.7.2017.

Evira (Evira 2016). Hyönteiset elintarvikkeina. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/valmistus-ja-myynti/yhteiset-koostumusvaatimukset/uuselintarvikkeet/hyonteiset-elintarvikkeina/> , haettu 18.7.2017.

Evira (Evira 2017a). Hyönteisiä rehuksi. https://www.evira.fi/globalassets/elaimet/rehut/tiedotteet/tied2017/tiedote_3740_0405_2017.pdf , haettu 18.7.2017.

Evira (Evira 2017b). Hyönteisruokaa pian lautasella. <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/ajankohtaista/2017/hyonteisruokaa-pian-lautasella/> , haettu 1.10.2017.

Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Cardinali F, Aquilanti L, Riolo P, Ruschioni S, Isidoro N, Clementi F. The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiol* 2017, 62: 15-22.

Giaccone V. Hygiene and Health Features of "Minilivestock". Teoksessa: Paoletti, MG (toim.) *Ecological Implications of Minilivestock : Potential of Insects, Rodents, Frogs and Snails*. Science Publishers, 2005: 579–598.

Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26: 163-171.

Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, White DG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69: 7153-7160.

Holt PS, Geden CJ, Moore RW, Gast RK. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-challenged hens. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 6030-6035.

Houben JH. Heat resistance of *Streptococcus faecium* in pasteurized ham. *Fleischwirtschaft (Germany, FR)* 1982, 4: 511-514.

Hugas M, Garriga M, Aymerich MT. Functionalty of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol* 2003, 88: 223-233.

Hultman J, Rahkila R, Ali J, Rousu J, Bjrkroth KJ. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81: 7088-7097.

Kawalec M, Kędzierska J, Gajda A, Sadowy E, Węgrzyn J, Naser S, Skotnicki AB, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infec* 2007, 13: 893-901.

Kloos WE. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annu Rev Microbiol* 1980, 34: 559-592.

Klunder HC, Wolkers-Rooijackers J, Korpela JM, Nout MJR. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 2012, 26: 628-631.

Komission asetus (EY) N:o 2073/2005, elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista. Euroopan unionin virallinen lehti L 338/1 22.12.2015: 1-26.

[http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:FI:PDF)
OJ:L:2005:338:0001:0026:FI:PDF

Leffer AM, Kuttel J, Martins LM, Pedroso AC, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira F, Ferreira AJP. Vectorial competence of larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* in the transmission of *Salmonella Enteritidis* in poultry. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, 10: 481-487.

Lundy ME, Parrella MP. Crickets are not a free lunch: protein capture from scalable organic side-streams via high-density populations of *Acheta domesticus*. *PloS one* 2015, 10: e0118785.

Markkula Irmeli. Kotisirkka (*Acheta domesticus*), Suomen Lajitietokeskus.
<https://laji.fi/taxon/MX.43193?locale=fi>, haettu 6.8.2017

Martin JD, Mundt JO. Enterococci in insects. *Appl Microbiol* 1972, 24: 575-580.

Megran DW. Enterococcal endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992, 15: 63-71.

Nakagaki BJ, Defoliart GR. Comparison of Diets for Mass-Rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food, and Comparison of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. *J Econ Entomol* 1991, 84: 891-896.

NVWA (Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority). Advisory report on the risks associated with the consumption of mass-reared insects. 2014.

Octavia S, Lan R. The family enterobacteriaceae. Teoksessa: *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*. 2014: 225-286.

Paoletti MG. Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. Science Publishers, Inc., 2005.

Rahkila R, Johansson P, Sde E, Bjrkroth J. Identification of Enterococci from Broiler Products and a Broiler Processing Plant and Description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77: 1196-1203.

Regnault B, Grimont F, Grimont P. Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. *Res Microbiol* 1997, 148: 649-659.

Roche AJ, Cox NA, Richardson LJ, Buhr RJ, Cason JA, Fairchild BD, Hinkle NC. Transmission of *Salmonella* to broilers by contaminated larval and adult lesser mealworms, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Poult Sci* 2009, 88: 44-48.

Sakamoto M. The family porphyromonadaceae. Teoksessa: *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. 2014: 811-824.

Shane SM, Montrose MS, Harrington KS. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis* 1985, 384-391.

Stackebrandt E. The family lachnospiraceae. Teoksessa: *The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes*. 2014: 197-201.

Stoops J, Crauwels S, Waud M, Claes J, Lievens B, Van Campenhout L. Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. *Food Microbiol* 2016, 53: 122-127.

Švec P, Franz, C M A P. The genus *Enterococcus*. Teoksessa: *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. 2014: 175-211

Turun yliopisto 2016. Suomalaiset ovat kiinnostuneita hyönteisruoasta – hyönteiset halutaan lautaselle jauhettuna.

<https://www.utu.fi/fi/Ajankohtaista/mediatiedotteet/Sivut/suomalaiset-ovat-kiinnostuneita-hyonteisruoasta%E2%80%93hyonteiset-halutaan-lautaselle-jauhettuna.aspx> , haettu 27.7.2017.

Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. Edible insects: future prospects for food and feed security. *BioOne*, 2013.

Vandeweyer D, Crauwels S, Lievens B, Van Campenhout L. Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus* and *Gryllobates sigillatus*) from different rearing companies and different production batches. *Int J Food Microbiol* 2016, 242: 13-18.

Vendrell D, Balczar JL, Ruiz-Zarzuela I, De Blas I, Girons O, Mzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2006, 29: 177-198.

Verbeke W. Profiling consumers who are ready to adopt insects as a meat substitute in a Western society. *Food Qual Prefer* 2015, 39: 147-155.

Vihavainen EJ, Murros AE, Björkroth KJ. *Leuconostoc* spoilage of vacuum-packaged vegetable sausages. *J Food Prot* 2008, 71: 2312-2315.

Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M. The Generalist Inside the Specialist: Gut Bacterial Communities of Two Insect Species Feeding on Toxic Plants Are Dominated by *Enterococcus* sp. *Front Microbiol* 2016, 7: 1005.

Wexler HM. The genus *Bacteroides*. *Teoksessa: The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. 2014: 459-484.

LIITTEET

Liite 1. Mirkrobiologisten määrittysten tulokset näytteittäin. CNF-koodilla nimetyt näytteet otettiin sirkoista jotka eivät paastonneet ja CF-koodilla nimetyt näytteet otettiin sirkoista jotka paastosivat 24h ennen keräämistä.

Näyte	Koliformiset		Aerobiset mikro- organismit	Homeet ja hiivat	
	Enterobakteerit	bakteerit Maitohappobakteerit			
	log pmy/g	log pmy/g	log pmy/g	log pmy/g	
CNF-1	6,18	5,00	8,13	7,71	<3,30
CNF-2	5,92	<3,00	7,66	7,94	5,38
CNF-3	5,96	-	7,68	7,88	5,59
CNF-4	4,81	<3,00	7,66	7,62	5,61
CNF-5	5,77	<3,88	7,60	7,75	5,51
CNF-6	5,72	<4,18	7,67	7,75	5,26
CNF-7	5,73	4,30	7,64	8,63	<3,00
CNF-8	4,44	3,77	7,34	8,70	<3,30
CNF-9	4,57	4,93	7,86	8,72	4,00
CNF-10	6,70	6,09	7,97	9,01	<3,85
Keskiarvo	5,58	4,24	7,72	8,17	4,48
Keskihajonta	0,70	0,94	0,21	0,50	1,03
CF-1	6,18	4,95	8,07	7,92	5,32
CF-2	6,19	>8,4	7,76	8,86	4,75
CF-3	7,15	>8,4	7,81	8,93	5,14
CF-4	6,50	>8,4	7,96	9,40	6,00
CF-5	6,57	>8,4	7,85	9,40	5,52
Keskiarvo	6,52	7,71	7,89	8,90	5,35
Keskihajonta	0,35	1,38	0,11	0,54	0,41